

BREVET D'INVENTION

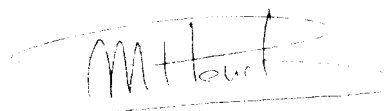
CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle



Martine PLANCHE





26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB : 40 W 1 608 99

14 DEC 2000 REMISE DES PIÈCES DATE 75 INPI PARIS LIEU N° D'ENREGISTREMENT 0016314 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI REF 2000		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE BREVATOME 3 rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) b 13736.3/JL DD 2151			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date / /
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date / /
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date / /
Demande de brevet initiale		N°	Date / /
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) SUPPORT SOLIDE POUR L'IMMOBILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public de Caractère Scientifique, Technique et Industriel	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse		31-33 rue de la Fédération	
Rue			
Code postal et ville		75752 PARIS 15ème	
Pays		FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 14 DEC 2000 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0016314 NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI		(Reçu de l'INPI)	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		B 13736.3 J1 DD 2151	
6 MANDATAIRE			
Nom		LEHU	
Prénom		Jean	
Cabinet ou Société		BREVATOME 422.5 S002	
N° de pouvoir permanent et/ ou de lien contractuel		7068 du 12.06.98	
Adresse	Rue	3 rue du Docteur Lancereaux	
	Code postal et ville	75008 PARIS	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.53.83.94.00	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.45.63.83.33	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		spibrevia-easynet.fr	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) J. LEHU 422-5 S 002		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI B PIQUET	

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Petersburg

75800 Paris Cedex 08


Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W 120044

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B13736.3 JL DD 2151	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		00.16314 du 14.12.00	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) SUPPORT SOLIDE POUR L'IMMOBILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES			
LE(S) DEMANDEUR(S) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31/33 rue de la Fédération 75752 PARIS 15ème			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		VINET	
Prénoms		Francoise	
Adresse	Rue	22 Bld Edouard Rey	
	Code postal et ville	38000	GRENOBLE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		CHATON	
Prénoms		Patrick	
Adresse	Rue	Loutre	
	Code postal et ville	38570	THEYS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		MITTLER	
Prénoms		Frédérique	
Adresse	Rue	44, route de Grenoble	
	Code postal et ville	38120	SAINT-EGREVE
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) PARIS le 4 AVRIL 2001 J. LEHU 422-5 S/002			



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

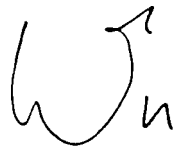
BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa
N° 11 235*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W 265899

Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i>		B13736.3 JL DD 2151	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		00.16314 du 14.12.00	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) SUPPORT SOLIDE POUR L'IMMOBILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES			
LE(S) DEMANDEUR(S) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31/33 rue de la Fédération 75752 PARIS 15ème			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		BARRITAU	
Prénoms		Pierre	
Adresse	Rue	54 rue de Stalingrad	
	Code postal et ville	38100	GRENOBLE
Société d'appartenance <i>(facultatif)</i>			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance <i>(facultatif)</i>			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance <i>(facultatif)</i>			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) PARIS LE 4 AVRIL 2001 J. LEHU 422-5 S/002			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

SUPPORT SOLIDE POUR L'IMMOBILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES**DESCRIPTION****Domaine technique**

5 L'invention concerne un support solide pour l'immobilisation d'oligonucléotides. Elle concerne aussi un procédé de réalisation d'un tel support solide.

10 Le support solide de l'invention est notamment utilisable pour réaliser des dispositifs d'analyse biologique miniaturisés ou biopuces. Ces biopuces selon l'invention peuvent être utilisées par exemple pour le séquençage, pour le criblage (ou "screening" en anglais) du polymorphisme simple de 15 nucléotide (SNP), l'étude de l'expression des gènes, l'identification de microorganismes, l'étude du transcriptome...

Etat de la technique antérieure

20 Les biopuces mettent en œuvre une technique de greffage d'oligonucléotides sur un support solide. Ces oligonucléotides peuvent être obtenus par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui fournit des fragments d'ADN de quelques centaines de bases. Ils peuvent être présynthétisés, auquel cas ils comportent 25 entre 6 et 100 mères, ou synthétisés in situ auquel cas ils comportent entre 6 et 60 mères.

La fabrication et l'utilisation de microréseaux (ou "microarrays" en anglais) contenant des sondes biologiques relèvent d'un domaine qui se 30 développe rapidement. Les microréseaux peuvent être

fabriqués par synthèse parallèle directement sur un support solide. Ils conduisent dans ce cas à des biopuces de haute densité (plus de 5000 sondes). Les microréseaux peuvent aussi être fabriqués par immobilisation de sondes sur la surface du support solide d'une biopuce. Cette dernière méthode est plus versatile puisqu'elle permet à la fois l'utilisation de produits naturels ou synthétiques qui peuvent être purifiés avant l'immobilisation.

Les supports solides sur lesquels les molécules biologiques sont généralement déposées sont des supports en verre, en silicium, en gel de polyacrylamide, en polymère (voir le brevet américain N° 5 919 523), en plastique (plaques micropuits). Il peut s'agir de membranes en nylon.

Différentes techniques sont utilisables pour déposer les composés biologiques sur les supports en des sites déterminés. Le pipetage permet le dépôt de microgouttes sur les sites : par jet d'encre, piézoélectrique ou par la méthode dite "pin and ring".

Quelle que soit la méthode de dépôt, le support solide doit être traité pour fournir des surfaces d'accrochage ou de greffage pour les molécules biologiques. Ce traitement de surface assure la formation de fonctions chimiques qui sont généralement des fonctions hydroxyles. Ces fonctions permettent d'assurer les étapes chimiques ultérieures de greffage. De plus, la densité des sites disponibles à cette étape va déterminer la densité finale de sondes biologiques sur le support.

Pour des supports en verre ou en silicium recouvert d'une couche d'oxyde, un nettoyage chimique de la surface permet de lui conférer des groupements hydroxyles, des molécules SiO_2 de surface donnant du SiOH . Le nettoyage peut être réalisé sous des conditions basiques (au moyen de soude ou d'ammoniaque) ou sous des conditions acides (au moyen d'acide chlorhydrique, d'acide sulfochromique ou d'acide sulfo-oxygéné). Des mesures faites par la méthode d'angle de goutte permettent de caractériser l'efficacité de la transformation de l'état de surface du support. L'efficacité du traitement sur l'immobilisation des sondes est caractérisée par hybridation avec des cibles complémentaires. Les observations de fluorescence montrent que, plus la surface du support est hydrophile, meilleure est l'immobilisation des sondes, ce qui permet l'obtention d'une plus grande densité de sondes sur le support.

Cependant, les supports solides de l'art connu présentent une homogénéité de surface pour la fixation des oligonucléotides qui n'est généralement pas assez satisfaisante.

Exposé de l'invention

La présente invention permet de remédier à ce problème de manque d'homogénéité pour la fixation des oligonucléotides.

Un premier objet de l'invention consiste en un support solide présentant une surface pour l'immobilisation d'oligonucléotides, caractérisé en ce que ladite surface est la surface d'un matériau choisi parmi HfO_2 , TiO_2 , Ta_2O_5 , ZrO_2 et un mélange comprenant au

moins l'un de ces matériaux, ladite surface ayant subi un traitement pour la rendre hydrophile.

Avantageusement, le matériau se présente sous la forme d'une couche déposée sur un substrat. 5 Cette couche peut posséder une épaisseur comprise entre quelques nanomètres et un micromètre. Le substrat peut être un substrat choisi parmi les substrats en verre, en plastique et en semiconducteur, par exemple en silicium.

10 Le matériau présentant cette surface d'immobilisation d'oligonucléotides peut être un mélange comprenant SiO_2 .

Un deuxième objet de l'invention consiste en une biopuce comprenant un support solide pour 15 l'immobilisation d'oligonucléotides tel que défini ci-dessus.

Un troisième objet de l'invention consiste en un procédé de réalisation d'un support solide présentant une surface pour l'immobilisation 20 d'oligonucléotides, le support comprenant un substrat supportant une couche de matériau dont la face libre constitue ladite surface, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- fourniture dudit substrat,
- 25 - dépôt sur le substrat d'une couche d'un matériau choisi parmi HfO_2 , TiO_2 , Ta_2O_5 , ZrO_2 et un mélange comprenant au moins l'un de ces matériaux,
- traitement de la face libre de ladite couche pour la rendre hydrophile.

30

L'étape de dépôt peut consister à déposer une couche de matériau d'une épaisseur comprise entre quelques nanomètres et un micromètre.

L'étape de fourniture du substrat peut
5 consister à fournir un substrat choisi parmi les substrats en verre, en plastique et en semiconducteur.

L'étape de dépôt peut consister à déposer un matériau comprenant SiO_2 .

L'étape de dépôt peut mettre en œuvre une
10 méthode de dépôt choisie parmi l'évaporation sous vide, la pulvérisation par faisceau d'ions, la pulvérisation radio-fréquence, la pulvérisation magnétron, le dépôt en phase vapeur de couches atomiques (ALCVD) et le dépôt sol-gel.

15 L'étape de traitement de la face libre de la couche déposée peut consister à nettoyer la couche par une solution basique ou par une solution acide.

Le procédé peut comporter une étape supplémentaire consistant à structurer la face libre de
20 ladite couche. Cette étape de structuration peut mettre en œuvre une technique choisie parmi la gravure sèche, la gravure humide et le "lift-off".

Brève description du dessin

25 L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et particularités apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre d'exemple non limitatif, accompagnée du dessin annexé qui est vue en perspective d'un support solide
30 présentant une surface pour l'immobilisation d'oligonucléotides, selon l'invention.

Description détaillée d'un mode de réalisation de l'invention

La figure annexée est une vue en perspective d'un support solide 1 selon l'invention. Le support solide 1 comprend un substrat 2 en un matériau permettant le dépôt d'une couche dont la face libre est destinée à constituer une surface pour l'immobilisation d'oligonucléotides. Le substrat 2 est par exemple en silicium.

Une couche 3 est déposée sur le substrat 2. Elle sert de précurseur d'accrochage pour les oligonucléotides. Elle est constituée, en partie ou en totalité, d'un oxyde (ou de plusieurs oxydes) de métal réfractaire TiO_2 , ZrO_2 , HfO_2 ou Ta_2O_5 . La couche déposée est une couche mince d'épaisseur comprise entre quelques nm et 1 μm . Cette couche peut être déposée par évaporation sous vide par canons à électrons à une température comprise entre 50 et 200°C environ. Elle peut être également déposée par pulvérisation par faisceau d'ions (IBS), par pulvérisation radio-fréquence ou magnétron. On peut citer également une technique récente de dépôt : le dépôt en phase vapeur de couches atomiques (ALCVD). On peut citer aussi le dépôt sol-gel.

Les matériaux pouvant constituer la couche mince selon l'invention peuvent être déposés, par les techniques d'évaporation PVD (canons à électrons, IBS, pulvérisation...), indifféremment sur du verre, du plastique, du silicium.

Les oxydes de ces métaux sont très stables vis-à-vis de solutions basiques, ce qui permet une transformation lente et uniforme de la surface.

Sans aucun traitement de surface, ces
5 matériaux sont hydrophobes. Dans le cas de l'oxyde d'hafnium, la mesure d'angle de goutte d'eau conduit à une valeur de 60° . Selon le traitement basique effectué, l'angle de goutte varie de 35° à 6° .

Des supports ainsi traités ont été utilisés
10 pour faire croître des oligonucléotides par synthèse in situ sur un support constitué d'une couche de HfO_2 sur un substrat en silicium. Pour un échantillon de faible hydrophilie (35°), le signal de fluorescence, après hybridation de sondes de 20 mères par des cibles
15 complémentaires, est faible et non uniforme. Un échantillon fortement hydrophile (6°) présente une nette amélioration, principalement en terme d'uniformité.

L'uniformité obtenue a été comparée à celle
20 d'un support solide couramment utilisé à savoir un support formé d'un substrat en silicium recouvert d'une couche d'oxyde thermique de $0,5 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Par rapport à ce support solide de l'art connu, le support selon l'invention (HfO_2 sur Si) procure une
25 amélioration de l'uniformité du signal de fluorescence.

Le même résultat a été obtenu avec un substrat en verre recouvert d'une couche de HfO_2 après immobilisation par liaison covalente de sondes de 20 mères présynthétisées.

Ce type de dépôt peut aussi être utilisé pour des biopuces employant la méthode d'immobilisation de sondes par interactions électrostatiques.

Le dépôt de ces oxydes de métaux
5 réfractaires permet tous les types de greffage utilisés dans les technologies des biopuces, à savoir tout support (verre, silicium, plastique) et tout type de technique de greffage biologique (synthèse in situ, immobilisation par liaison covalente ou liaisons
10 électrostatiques).

Les résultats des mesures montrent une amélioration de l'uniformité des signaux de fluorescence par rapport à l'état de l'art.

15

REVENDICATIONS

1. Support solide (1) présentant une surface (4) pour l'immobilisation d'oligonucléotides, caractérisé en ce que ladite surface (4) est la surface d'un matériau choisi parmi HfO_2 , TiO_2 , Ta_2O_5 , ZrO_2 et un mélange comprenant au moins l'un de ces matériaux, ladite surface ayant subi un traitement pour la rendre hydrophile.

10

2. Support solide selon la revendication 1, caractérisé en ce que le matériau se présente sous la forme d'une couche (3) déposée sur un substrat (2).

15

3. Support solide selon la revendication 2, caractérisé en ce que la couche (3) possède une épaisseur comprise entre quelques nanomètres et un micromètre.

20

4. Support solide selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que le substrat (2) est un substrat choisi parmi les substrats en verre, en plastique et en semiconducteur.

25

5. Support solide selon la revendication 4, caractérisé en ce que le substrat (2) est en silicium.

30

6. Support solide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit matériau est un mélange comprenant SiO_2 .

7. Biopuce caractérisée en ce qu'elle comprend un support solide (1) pour l'immobilisation d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

5

8. Procédé de réalisation d'un support solide (1) présentant une surface (4) pour l'immobilisation d'oligonucléotides, le support (1) comprenant un substrat (2) supportant une couche (3) de
10 matériau dont la face libre constitue ladite surface, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- fourniture dudit substrat (2),
- dépôt sur le substrat (2) d'une couche (3) d'un matériau choisi parmi HfO_2 , TiO_2 , Ta_2O_5 , ZrO_2 et
15 un mélange comprenant au moins l'un de ces matériaux,
- traitement de la face libre de ladite couche (3) pour la rendre hydrophile.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'étape de dépôt consiste à
20 déposer une couche (3) de matériau d'une épaisseur comprise entre quelques nanomètres et un micromètre.

10. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'étape de fourniture du substrat
25 (2) consiste à fournir un substrat choisi parmi les substrats en verre, en plastique et en semiconducteur.

11. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'étape de dépôt consiste à
30 déposer un matériau comprenant SiO_2 .

12. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'étape de dépôt met en œuvre une méthode de dépôt choisie parmi l'évaporation sous vide, la pulvérisation par faisceau d'ions, la pulvérisation radio-fréquence, la pulvérisation magnétron, le dépôt en phase vapeur de couches atomiques (ALCVD) et le dépôt sol-gel.

10 13. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'étape de traitement de la face libre de la couche (3) déposée consiste à nettoyer la couche par une solution basique ou par une solution acide.

15 14. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comporte une étape supplémentaire consistant à structurer la face libre de ladite couche (3).

20 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'étape de structuration met en œuvre une technique choisie parmi la gravure sèche, la gravure humide et le "lift-off".

25

1 / 1

